

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006077

International filing date: 30 March 2005 (30.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-102879
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 3 1 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 1 0 2 8 7 9

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 4 - 1 0 2 8 7 9

出 願 人
Applicant(s): 新 家 一 男
夏 目 徹
土 井 隆 行

2 0 0 5 年 4 月 2 7 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	P195
【提出日】	平成16年 3月31日
【あて先】	特許庁長官殿
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都文京区千駄木5－13－6
【氏名】	新家 一男
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都目黒区目黒1－17－21－103
【氏名】	夏目 徹
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県横浜市栄区本郷台1－17－5
【氏名】	土井 隆行
【特許出願人】	
【住所又は居所】	東京都文京区千駄木5－13－6
【氏名又は名称】	新家 一男
【特許出願人】	
【識別番号】	500352845
【氏名又は名称】	夏目 徹
【特許出願人】	
【住所又は居所】	神奈川県横浜市栄区本郷台1－17－5
【氏名又は名称】	土井 隆行
【代理人】	
【識別番号】	100112874
【弁理士】	
【氏名又は名称】	渡邊 薫
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	076005
【納付金額】	21,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1
【物件名】	委任状A 1
【援用の表示】	平成16年3月24日提出の包括委任状
【物件名】	委任状B 1
【援用の表示】	平成16年3月29日提出の包括委任状
【包括委任状番号】	0113479

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

次の（１）、（２）の物質から構成されたラベル用物質。

（１）生体物質と相互作用可能なプローブ物質に結合可能な化学構造を有する有機化合物。

（２）該有機化合物に結合され、かつ抗体が特異的に認識するペプチド。

【請求項 2】

前記プローブ物質は、ペプチド又はタンパク質以外の物質であることを特徴とする請求項 1 記載のラベル用物質。

【請求項 3】

前記有機化合物は、少なくとも一末端にカルボキシル基を有する脂溶性又は水溶性の有機化合物であって、該カルボキシル基を介して前記ペプチドと結合する構成であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のラベル用物質。

【請求項 4】

前記ペプチドは、エピトープタグペプチドであり、前記抗体は、抗エピトープタグペプチド抗体である、ことを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれかに一項に記載のラベル用物質。

【請求項 5】

前記有機化合物はスペーサとして機能し、前記ペプチドは抗体結合性のタグ（T a g）として機能することを特徴とする請求項 1 記載のラベル用物質。

【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載されたラベル用物質を、固相法に基づいて作製することを特徴とするラベル用物質の作製方法。

【請求項 7】

有機化合物と、該有機化合物に結合され、かつ抗体が特異的に認識するペプチドと、からなるラベル用物質を、

前記有機化合物の一末端官能基を介して、生体物質と相互作用可能なプローブ物質にラベルすることを特徴とするプローブ物質のラベル方法。

【請求項 8】

生体物質と相互作用可能なペプチド又はタンパク質以外のプローブ物質と、該プローブ物質に直接又は間接的に結合され、かつ抗体が特異的に認識するペプチドと、から構成されるキメラ物質。

【請求項 9】

請求項 8 記載のキメラ物質を、固相法に基づいて作製することを特徴とするキメラ物質の作製方法。

【請求項 10】

生体物質と相互作用可能なプローブ物質に結合可能な化学構造を有する有機化合物と、該有機化合物に結合し、かつ抗体が特異的に認識するペプチドと、からなるラベル物質を用いる方法であって、

次の（A）、（B）の手順を少なくとも行うことを特徴とする生体物質の捕捉方法。

（A）前記ラベル物質が結合された状態の前記プローブ物質と、該プローブ物質と相互作用した生体物質と、から構成される生体物質複合体を含む試料溶液を、前記固相表面領域へ導く手順。

（B）固相表面に固定化された抗体と前記生体物質複合体を構成する前記ラベル用物質中のペプチドとの相互作用を進行させる手順。

【請求項 11】

次の（a）～（c）の手順を少なくとも行うことを特徴とする生体物質の構造解析又は／及び同定方法。

（a）請求項 8 記載の生体物質複合体中のペプチドと固相表面に固定化された抗体とを解離させる手順。

(b) 解離させた生体物質複合体を回収する手順。

(c) 前記生体物質複合体中の生体物質の構造解析又は／及び同定を行う手順。

【請求項 12】

次の(i)～(iv)の手順を少なくとも行うことを特徴とする細胞内生体物質の回収方法。

(i) 有機化合物と、該有機化合物に結合され、かつ抗体を特異的に認識可能なペプチドと、からなるラベル用物質を、前記有機化合物の一末端官能基を介して、プローブ物質にラベルする手順。

(ii) ラベルされた状態のプローブ物質を細胞内に導入する手順。

(iii) 前記プローブ物質と細胞内生体物質との間の相互作用を細胞内で進行させる手順。

(iv) 前記相互作用により得られた生体物質複合体を細胞外に取り出す手順。

【請求項 13】

前記細胞内生体物質は、タンパク質、ペプチド、核酸、糖、脂質、ホルモンのいずれかであることを特徴とする請求項 12 記載の細胞内生体物質の回収方法。

【請求項 14】

請求項 12 又は 13 の記載の方法によって回収された細胞内生体物質を、少なくとも請求項 10 に記載された方法を用いて捕捉する方法。

【請求項 15】

請求項 12 又は 13 の記載の方法によって回収された細胞内生体物質を、少なくとも請求項 11 に記載された方法を用いて構造解析又は／及び同定する方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ラベル用物質とキメラ物質、これらの物質の作製方法、並びに該ラベル用物質を用いて生体物質を捕捉、構造解析又は／及び同定する方法

【技術分野】

【０００１】

本発明は、生体物質と相互作用可能なプローブ物質に結合可能であり、かつ抗体を特異的に認識できる機能を有するラベル用物質とこのラベル用物質を用いたバイオアッセイ技術に関する。

【背景技術】

【０００２】

本発明に係わる第一の従来技術として、金属薄膜、合成樹脂、ガラス等の基板やビーズなどの固相の表面に、標的物質を検出するための探り針の役目を果たす物質（以下「プローブ物質」という。）を予め固定した後に、物質間の特異的な相互作用を利用して、標的物質を捕捉、回収し、この標的物質を質量分析などにより構造解析する技術を挙げる。この技術によれば、前記プローブ物質に相互作用する物質を突き止めることができる。

【０００３】

また、前記技術では、プローブ物質と固相表面との間にリンカー、スペーサ、あるいはタグなどと称される物質が介挿されたり、ラベルされたりすることにより、プローブ物質と固相表面との間の結合力の調整、立体障害の解消、反応空間の利用効率向上などが試みられることがある。このような技術は、表面プラズモン共鳴センサーやDNAやタンパク質などを集積したマイクロアレイチップなどのバイオセンサー技術、免疫沈降法などの重要な要素技術となっている。

【０００４】

固相表面に対するプローブ物質の固定化には、「アビジンービオチン結合系」が広く一般的に使用されている。アビジン（avidin）は、ビオチン（biotin）と特異的に強く結合する糖タンパク質である。このアビジンは、ビオチンとの親和性が極めて高いことから、ビオチン化したDNA、ペプチド、タンパク質などを固定化するのに利用されている。例えば、固相表面にストレプトアビジンなどのアビジンを予めコートしておくことにより、これにビオチン化したプローブ物質を確実に結合（固定化）させることができる。その他、アビジンービオチン系は、エンザイムイノムアッセイ（EIA）などの免疫学的測定や組織染色の分野でも広く利用されている。

【０００５】

ここで、「アビジンービオチン結合系」を用いた先行技術を幾つか挙げる。まず、特許文献１には、固定されたアビジン又はストレプトアビジンに、ビオチン化された抗原又は抗体を結合させた後に、試料中の抗体又は抗原と特異的に結合する標識化合物の溶液と接触させ、「標識された抗原ー抗体複合体」を検出する技術が開示されている。また、特許文献２には、アビジン分子が単層に固定化された固相化膜に、ビオチン化したプローブDNAを含む溶液をスポットしてDNAマイクロアレイを得る技術が開示されている。

【０００６】

次に、本発明に係る第二の従来技術として、「エピトープ・タグペプチド」を用いた相互作用解析技術を挙げる。

【０００７】

例えば、非特許文献１には、次の技術が開示されている。まず、エピトープ・タグペプチドが融合された組換えタンパク質を発現させておき、このエピトープ・タグペプチドを特異的に認識する抗体が固定化されたビーズを用いて、この抗体ビーズを細胞抽出液と混合する。この該細胞抽出液中の標的タンパク質を組換えタンパク質を介してトラップし、このビーズをよく洗浄してエピトープ・タグペプチドを過剰量添加して、前記ビーズ上にトラップされたタンパク質を添加ペプチドと置換することにより、この標的タンパク質（と組換えタンパク質の融合体）を液相中に溶出する。

【０００８】

即ち、非特許文献1には、「タンパク質－ペプチドタグ」という構成の融合体を用いた相互作用解析技術が開示されている。このタンパク質－ペプチドタグ融合体は、アミノ酸によって一連配列された同種物質同士の融合体であるから、生体内の遺伝子翻訳系を利用することによって合成可能な物質である。

【特許文献1】特開平09－133683号公報。

【特許文献2】特開2002－153272号公報。

【非特許文献1】実験医学別冊・ポストゲノム時代の実験講座2「プロテオーム解析法／タンパク質発現・機能解析の先端技術とゲノム医学・創薬研究」（羊土社）、磯辺俊明 高橋信弘編、P166－174。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

まず、アビジン－ビオチン系からなる固相表面構成を採用した場合では、固相表面にコートされたアビジンに捕捉されたビオチン化物質、あるいはこのビオチン化物質と他物質の複合体を回収する作業を行うときに、アビジン－ビオチン結合の親和性が極めて高いため、該結合を解離させる解離条件を厳しくせざるを得ない。そうすると、固相表面に非特異的に吸着した物質も一緒に回収されてしまうため、解析の標的となるビオチン化された物質、あるいは該ビオチン化された物質に相互作用を示した標的物質を同定する際の障害となるという問題があった。

【0010】

また、ビオチンは、溶解性が低い故に、取り扱い性が悪く、リンカーとしては利用し難いという基本的な問題を抱えている。そして、このビオチン自体が不特定のタンパク質等と相互作用し易いことから、特に、同定対象の標的物質がタンパク質などの場合では、ビオチン化物質をプローブ物質として採用するのは好ましくない。また、ビオチン化物質を細胞内へ導入すると、該ビオチン化物質に対して、不特定多数のタンパク質を含む生体高分子が非特異的に吸着するので、これをプローブ物質として利用することも好ましくない。

【0011】

さらに、従来の「タンパク質－エピトープ・タグペプチド融合体」を用いた相互作用解析技術は、アミノ酸から構成される物質同士を融合して用いる発想である。これは、細胞内の翻訳系を利用してタンパク質－エピトープ・タグペプチド融合体を合成する技術を前提としている。

【0012】

そこで、本発明は、固相表面に対する可逆的固定（可逆的着脱）が可能なラベル用物質を提供し、このラベル用物質を用いて標的物質の回収を容易化し、かつ前記ラベル用物質に結合させたプローブ物質と相互作用する標的生体物質を確実かつ高精度に同定できる技術を提供することを主な目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明では、第一に、「生体物質と相互作用可能なプローブ物質に結合可能な化学構造を有する有機化合物」と「該有機化合物に結合され、かつ抗体が特異的に認識するペプチド」とから構成されたラベル用物質を提供する。

【0014】

この「ラベル用物質」の物質構成を簡略に記載すれば、「有機化合物－ペプチド」という構成である。

【0015】

第二には、「生体物質と相互作用可能なペプチド又はタンパク質以外のプローブ物質」と、「該プローブ物質に直接又は間接的に結合され、かつ抗体が特異的に認識するペプチド」と、から構成されたキメラ物質を提供する。なお、前記した「間接的に結合」とは、プローブ物質とペプチドの間に他の物質を介在させた結合を意味する。

【0016】

この「キメラ物質」の物質構成を簡略に記載すれば、(1)「プローブ物質(ペプチド又はタンパク質以外)ーペプチド」、(2)「プローブ物質(ペプチド又はタンパク質以外)ー介挿物質ーペプチド」、以上(1)、(2)のいずれかの構成である。

【0017】

「プローブ物質」としては、ペプチド又はタンパク質以外の物質、即ちアミノ酸配列からなる物質以外の物質であり、特に低分子化合物を視野に入れることができる。これにより、ペプチドに対して、ペプチドとは全く異種の物質を組み合わせた複合体である、標的物質のトラップに有用な「キメラ物質」を全く新規に提供することができる。

【0018】

この「キメラ物質」は、アミノ酸のみで構成されておらず、生体の遺伝子翻訳系で合成できるものでもないため、アミノ酸のみで構成された従来のタンパク質ーエピトープ・タグペプチド融合体とは、その発想を全く異にする、異種物質間の複合体であると言える。

【0019】

なお、本発明に係わる「プローブ物質」としては、低分子化合物以外にも、ペプチド又はタンパク質以外の物質であれば、目的に応じて、適宜採用可能である。例えば、核酸、脂質、糖、低分子のホルモン(ペプチドホルモン除く。)、毒性物質、内分泌攪乱物質、神経伝達物質などを採用することができる。仮に、毒性物質や内分泌攪乱物質を採用した場合は、当該物質と相互作用する物質を同定できるので、毒性等の原因物質や毒性の機作を突き止めるができる。

【0020】

本発明に係るラベル用物質の必須の構成員である「有機化合物」、あるいは本発明に係るキメラ物質の構成員となり得る「有機化合物」(介挿物質)は、主に、スペーサとして機能させるための物質である。この有機化合物は、上記プローブ物質に結合可能な化学構造を有するものであればよく、狭く限定されない。

【0021】

有機化合物の一例を挙げるならば、少なくとも一末端にカルボキシル基を有する脂溶性又は水溶性の有機化合物であって、該カルボキシル基を介して前記ペプチドと結合する構成の物質である。プローブ物質とペプチドとの間に有機化合物を介在させることで、親媒性を選択及び調整できるようになるため、アッセイ系における取り扱い性や細胞内への取り込み動態を自在に調整できるようになる。

【0022】

次に、本発明に係るラベル用物質又はキメラ物質の必須の構成員である「ペプチド」は、抗体が特異的に認識するペプチドであり、有機化合物、あるいはプローブ物質に結合可能なものであれば、狭く限定されない。

【0023】

一例を挙げれば、抗体結合性のタグ(Tag)として機能させることができるものを採用できる。例えば、フラッグ(FLAG)ペプチド(Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys)などのエピトープ・タグペプチドを採用することができる。

【0024】

この場合、このペプチドを認識する抗体は、抗エピトープ・タグペプチド抗体、例えば、抗フラッグ(FLAG)ペプチド抗体である。

【0025】

第三に、本発明では、有機化合物と、該有機化合物に結合され、かつ抗体が特異的に認識するペプチドと、からなるラベル用物質を、前記有機化合物の一末端官能基を介して、生体物質と相互作用可能なプローブ物質にラベルする「プローブ物質のラベル方法」を提供する。

【0026】

なお、このラベル方法を用いれば、「プローブ物質ー有機化合物ーペプチド」という構

成からなるキメラ物質の一実施例を作製又は製造することができる。

【0027】

第四に、本発明では、上記したラベル用物質又はキメラ物質を、固相法に基づいて作製する「ラベル用物質の作製方法」を提供する。ラベル用物質を「固相法」に基づいて作製又は製造することによって、その合成のコントロールが容易となるなどの利点がある。

【0028】

例えば、有機化合物の一方の末端官能基に保護基を導入した上で、他の遊離末端官能基を固相担体に固定し、その後、この有機化合物の保護基をはずして、ペプチドを結合し、続いて、この有機化合物を前記固相担体から解離させることによって、「有機化合物ーペプチド」という物質構成からなるラベル用物質を作製できる。

【0029】

あるいは、ペプチドの所定の官能基に保護基を導入した上で、一末端官能基を固相に固定化し、その後、このペプチドのN末端又はC末端に有機化合物を結合して伸長し、次に、該ペプチドを前記固相から解離させることによって、「有機化合物ーペプチド」という物質構成からなるラベル用物質を作製できる。

【0030】

さらに、このようにして作製されたラベル用物質中の有機化合物の遊離末端官能基に対して、低分子化合物などのプローブ物質を導入すれば、「プローブ物質ー有機化合物ーペプチド」という物質構成からなるキメラ物質の一実施例を得ることができる。

【0031】

第五に、本発明では、生体物質と相互作用可能なプローブ物質に結合可能な化学構造を有する有機化合物と、該有機化合物に結合し、かつ抗体が特異的に認識するペプチドと、からなるラベル物質を用いる「生体物質の捕捉方法」を提供する。

【0032】

具体的には、(A) 前記ラベル物質が結合された状態の前記プローブ物質と、該プローブ物質と相互作用した生体物質と、から構成される生体物質複合体を含む試料溶液を、前記固相表面領域へ導く手順、(B) 固相表面に固定化された抗体と前記生体物質複合体を構成する前記ラベル用物質中のペプチドとの相互作用を進行させる手順、を少なくとも行う「生体物質の捕捉方法」を提供する。

【0033】

本方法では、上記(A) 手順によって、「生体物質ープローブ物質ーラベル用物質(有機化合物ーペプチド)」という物質構成からなる生体物質複合体を固相表面に導入し、続いて、(B) 手順を経て、「生体物質ープローブ物質ーラベル用物質(有機化合物ーペプチド)ー抗体ー固相」という物質構成を形成する。これにより、固相表面に、ラベル用物質等を介して生体物質を捕捉することができる。

【0034】

第六に、本発明では、生体物質と相互作用したプローブ物質に結合した有機化合物と、該有機化合物に結合し、かつ抗体を特異的に認識可能なペプチドと、からなるラベル物質を用いる「生体物質の解析又は／及び同定方法」を提供する。

【0035】

具体的には、(a) 前記ラベル物質中のペプチドと固相表面に固定化された抗体とを解離させる手順、(b) 解離させた生体物質複合体を回収する手順、(c) 前記生体物質複合体中の生体物質の解析又は／及び同定を行う手順、を少なくとも行う「生体物質の解析方法」を提供する。

【0036】

本方法では、「生体物質ープローブ物質ーラベル用物質(有機化合物ーペプチド)ー抗体ー固相」という物質構成中の「ペプチドー抗体」間の結合が、可逆的に着脱可能であるという特徴を有しているので、当該結合を緩やかな条件で解離させることができる。

【0037】

この解離によって、「生体物質ープローブ物質ーラベル用物質(有機化合物ーペプチド

）」という構成の生体物質複合体を固相表面から溶出させて回収し、最終的には、標的の「生体物質」の構造解析を行い、当該物質の同定を行うことができる。

【0038】

第七に、本発明では、「細胞内生体物質の回収方法」を提供する。

【0039】

具体的には、(i)有機化合物と、該有機化合物に結合され、かつ抗体を特異的に認識可能なペプチドと、からなるラベル用物質を、前記有機化合物の一末端官能基を介して、プローブ物質にラベルする手順、(ii)ラベルされた状態のプローブ物質を細胞内に導入する手順、(iii)前記プローブ物質と細胞内生体物質との間の相互作用を細胞内で進行させる手順、(iv)前記相互作用により得られた生体物質複合体を細胞外に取り出す手順、以上の(i)～(iv)の手順を少なくとも行う「細胞内生体物質の回収方法」を提供する。

【0040】

この方法では、まず、プローブ物質に対して、「有機化合物ーペプチド」という構成の物質をラベル（標識）し、「プローブ物質ー有機化合物ーペプチド」を得る。そして、これを所定の方法で、細胞内に導入し、該細胞内で「細胞内生体物質ー有機化合物ーペプチド」という生体物質複合体を得て、これを細胞外に取り出し、これを回収する。なお、「細胞内生体物質」としては、例えば、タンパク質、ペプチド、核酸、糖、脂質、ホルモンなどを挙げることができる。

【0041】

試料溶液中の生体物質複合体は、ラベル用物質のペプチドと抗体の特異的結合を利用して固相表面に捕捉した後に解離、溶出、回収する手順などを経て、最終的には、細胞内生体物質を解析、同定することができる。

【0042】

ここで、本発明で使用する主たる技術用語の定義付けを行う。

【0043】

本発明における「プローブ物質」は、相互作用の相手となる標的物質の探り針となる物質であり、「ラベル用物質」は、このプローブ物質に化学的に標識される物質を意味する。

【0044】

「キメラ物質」は、例えば、「低分子化合物」と「ペプチド」、「核酸」と「ペプチド」、「糖」と「ペプチド」、「脂質」と「ペプチド」などのような異種物質を組み合わせた複合体を意味し、「タンパク質」と「エピトープ・タグペプチド」とから構成されるような、同種物質間の融合体とは明らかに区別される。

【0045】

「相互作用」は、物質間の非共有結合、共有結合、水素結合を含む化学的結合あるいは解離を広く意味し、例えば、核酸（ヌクレオチド鎖）間の相補結合であるハイブリダイゼーション、高分子ー高分子、高分子ー低分子、低分子ー低分子の特異的な結合又は会合を広く含む。

【0046】

「エピトープ・タグペプチド」とは、抗体のエピトープ（抗原決定基）部分が特異的に認識する10アミノ酸前後のオリゴペプチドである。現在、FLAGペプチド（Sigma社）を含む数種類程度が市販されている。

【発明の効果】

【0047】

本発明に係るラベル用物質やキメラ物質を用いた方法は、固相表面に対して可逆的に着脱できるので、非常に緩やかな条件で固相表面から解離、溶出させることができる。従って、このラベル用物質に結合されたプローブ物質、あるいはキメラ物質を構成するプローブ物質にトラップされている標的生体物質の捕捉及び回収を容易かつ自在に行うことができる。

【0048】

また、解析に用いられる試料中への非特異的に固相表面に吸着した物質の混在が極めて少ないことから、前記標的生体物質の構造解析、同定の障害が非常に少なく、迅速に構造解析し、さらには同定することができ、また、この同定結果の信頼性も非常に高い。

【0049】

ラベル用物質を構成する有機化合物、あるいはキメラ物質を構成し得る有機化合物の親媒性の選択又は調整を行うことが可能であるため、同ラベル用物質のアッセイ過程での取り扱い性や細胞への取り込み動態を調整することができる。

【0050】

ラベル用物質やキメラ物質を固相法で作製又は製造することによって、合成のコントロールが自由にできる。例えば、ペプチドに結合される有機化合物の親媒性の調整、同有機化合物の構造の選択又は調整、ペプチドや有機化合物の分子長の設計などを、目的に応じて、自由に行うことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0051】

本発明に係るラベル用物質及びキメラ物質の概念及び形態を示す模式図である図1に基づいて説明する。

【0052】

図1における符号Lは、本発明に係る「ラベル用物質」を、符号Hは、本発明に係る「キメラ物質」の一実施例（有機化合物を介して、プローブ物質とペプチドとが複合した構成の実施例）を、それぞれ示している。なお、図示はしないが、プローブ物質とペプチドが直接結合した構成のキメラ物質も採用可能であり、かかる物質も本発明の範囲である。

【0053】

まず、ラベル用物質Lは、符号Sで示された有機化合物と、この有機化合物Sの一末端部S₁に結合しているペプチドTと、から構成されている。

【0054】

ここで、ラベル用物質Lの必須の構成員である有機化合物Sは、生体物質と相互作用可能な「プローブ物質P」に対して結合できる化学構造を有するものであればよく、狭く限定されない。

【0055】

例えば、少なくとも一末端S₁にカルボキシル基を有する脂溶性又は水溶性の有機化合物を挙げることができる。この場合、有機化合物Sは、カルボキシル基を介して、前記ペプチドTとアミド結合することができる。

【0056】

有機化合物Sの親媒性の程度を調整することにより、ラベル用物質Lの細胞内への取り込み動態を調節できたり、アッセイ系での取り扱い性などを調節できたりするという利点がある。

【0057】

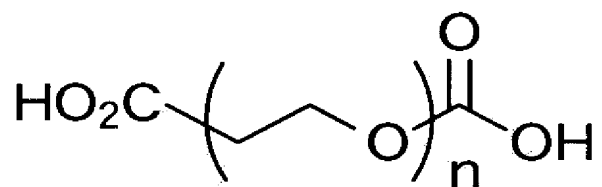
この有機化合物Sをスペーサとして機能させる場合には、特に、直鎖状に伸長する構造を有するものが好適であり、その分子長は、目的や必要に応じて設計すればよい。

【0058】

なお、本発明に係るラベル用物質Lに特に好適と考えられる有機化合物Sは、次のような化学構造を有する水溶性の有機化合物である。この有機化合物は、ポリエーテル鎖を有し、一方の末端にカルボン酸を備える。

【0059】

【化 1】

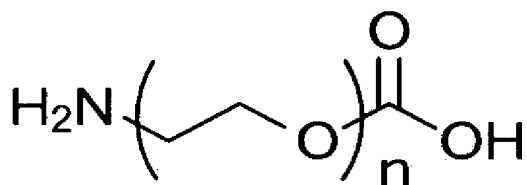


【0060】

次の有機化合物 S の候補は、上記同様にポリエーテル鎖を有し、一方の末端にアミノ基を備えるものである。

【0061】

【化 2】

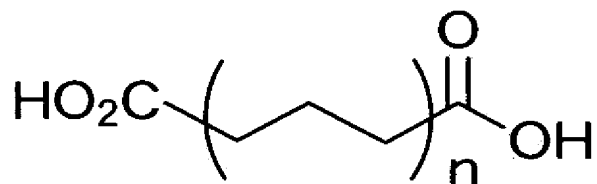


【0062】

また、有機化合物 S として、次のような化学構造を有する脂溶性の有機化合物も採用可能である。この有機化合物は、アルキル鎖を有し、一方の末端にカルボン酸を備える。このような有機化合物 S は、脂溶性であるので生体膜との親和性が高く、膜を透過し易い。

【0063】

【化 3】

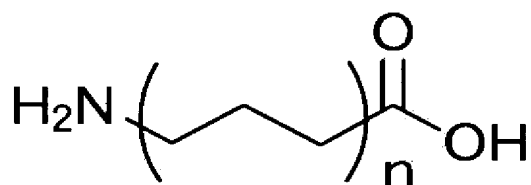


【0064】

次の有機化合物 S の候補は、上記同様にアルキル鎖を有し、一方の末端にアミノ基を備えるものである。

【 0 0 6 5 】

【化 4】



【 0 0 6 6 】

次に、ラベル用物質Lやキメラ物質Hの必須の構成員であるペプチドTは、抗体が特異的に認識するペプチドであれば採用可能である。有機化合物S、あるいはプローブ物質Pに対するペプチドTの結合末端は、C末端とN末端のいずれでもよく、特に限定されない。

【 0 0 6 7 】

このペプチドTは、抗体結合性のタグ (T a g) として機能させることができる。例えば、エピトープ・ペプチドタグの一種であるフラッグ (F l a g) ペプチド (アミノ酸配列: A s p - T y r - L y s - A s p - A s p - A s p - L y s) などを、目的に応じて、採用することができる。

【 0 0 6 8 】

場合によっては、抗体が認識できる程度の範囲で、このペプチドTを一アミノ酸残基 (例えば、リジン残基) 又は数アミノ酸残基だけ伸長させた後、これを有機化合物Sに結合してもよい。

【 0 0 6 9 】

次に、図2は、固相表面上に固定された抗体が、ペプチドTを特異的に認識している状態を模式的に示す図である。

【 0 0 7 0 】

まず、図2中の符号Fは、固相表面を示している。この固相表面Fは、平板状の基板表面やビーズ表面などの一部分を表している。この固相表面Fは、例えば、符号Aで示された抗体を、固定化可能な表面処理を予め行っておく。なお、本発明において、この固相表面F自体は、狭く限定されず、抗体Aを確実に固定化できる表面構成、あるいは材料が採用されていればよい。

【 0 0 7 1 】

抗体Aは、ペプチドTを特異的に認識可能な抗ペプチドT抗体である。図2には、抗体Aがラベル用物質L中のペプチドTを認識している様子が模式的に示されている。

【 0 0 7 2 】

この図2で示されているラベル用物質Lは、スペーサの役割を果たす有機化合物Sの一末端に結合されたプローブ物質Pと、固相表面F領域に送液、添加、注入等されてきた試料溶液R中に含まれている標的の生体物質Bと、が相互作用し、その結果、生体物質Bが固相表面Fに捕捉されている様子が示されている。

【 0 0 7 3 】

なお、生体物質Bがプローブ物質Pと相互作用を示したか否かは、表面プラズモン共鳴原理や水晶発振子原理などの公知の検出原理を用いて検出することができる。

【 0 0 7 4 】

プローブ物質Pは、低分子化合物を代表例として挙げるができるが、更には、ペプチド又はタンパク質以外の核酸、脂質、糖、低分子のホルモン (ペプチドホルモン除く)、内分泌攪乱物質、毒性物質、神経伝達物質なども挙げるができる。

【0075】

なお、このプローブ物質Pが「医薬候補物質」である場合では、このプローブ物質Pと相互作用する相手方の生体物質Bを同定できれば、このプローブ物質P自体が、当該生体物質Bに係わる疾病をターゲットとする医薬となり得る。

【0076】

次に、上記した「ラベル用物質Lを作製する方法」の好適な実施例について、図3から図5を参照しながら、説明する。

【0077】

なお、以下では、有機化合物Sとして上記化学式1に示された物質を用い、ペプチドTにはF l a g ペプチドを用いた場合を代表例として説明するが、これに限定されるわけではない。

【0078】

ラベル用物質Lは、好適には、いわゆる「固相法」に基づいて作製又は製造することができる。図3等に符号Xで示された固相担体(Solid-support)としては、例えば、ランタン(Mimotopes社製)を使用することができる。その他、ポリスチレンなどの固相担体を利用できる。ラベル用物質を「固相法」に基づいて作製又は製造すると、その合成のコントロールがし易いという利点が生まれる。

【0079】

この固相担体X上で、F l a g ペプチド(符号T)を伸長させるために使用するリンカー(Linker)Y(図3参照)としては、酸性条件で前記F l a g ペプチドTを固相担体Xから切断することができ、切断されたペプチド末端がカルボン酸となるようなものを使用することができる。

【0080】

リンカーYとして、例えば、トリチルリンカーを使用することができる。その他、クロロトリチルリンカーやアルコキシベンジルリンカー、ベンジルリンカーなどが使用可能である。

【0081】

ペプチドTの伸長反応は、例えば、公知のF m o c法を利用することができる。即ち、保護基F m o cで保護されたアミノ酸(アミノ酸側鎖は、t-butyl基で保護されたもの)を固相担体Xにカップリングする。

【0082】

このカップリングは、ジイソビルカルボジイミド(diisopropylcarbodiimide、以下D I C)等を縮合剤として用いて、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(1-hydroxybenzotriazole、以下H O B t)存在下、DMF中室温で数時間から48時間反応させる。次いで、DMF、ジクロロメタン(dichloromethane)で洗浄する。

【0083】

ペプチドTの伸長は、保護基F m o cを20%ピペリジン(pyperidine)のDMF溶液で室温、30分間放置し脱保護した後、洗浄後、以上の操作を繰り返し行うことにより進行させることができる。

【0084】

ペプチドTが、例えば、F l a g ペプチドのみで構成する場合は、そのアミノ酸配列は、A s p - T y r - L y s - A s p - A s p - A s p - A s p - L y sであるが、さらに、このペプチドTを伸長させたい場合は、アミノ酸残基を付加する。

【0085】

なお、アミノ酸残基の付加には、限界はあるが、少なくとも抗体A(図2等参照)が認識できる程度のペプチドなら採用可能である。

【0086】

図3に示された実施例では、F l a g ペプチド(符号T)の末端に、リジン残基(L y s)が一つ付加導入された構成が開示されている。なお、付加されたリジン残基(L y s)を、図3中に矢印で示す。

【0087】

次に、スペーサとして機能させる有機化合物Sの導入方法は、例えば、少なくとも一方の末端がカルボン酸であるようなポリエーテル鎖(例えば、 $n=5$ のもの)を、ペプチドTとして利用できるF l a g ペプチドへ導入する。

【0088】

この導入方法は、D I C等を縮合剤として用いて行うことが可能である。なお、有機化合物Sとしては、図4で示された水溶性物質の他に、上記したような脂溶性物質(アルキル鎖のもの)も採用可能である。

【0089】

また、両親媒性とするため、末端リジン残基のアミノ基上に、アルキル鎖を導入するのが効果的であると思われる。例えば、図5に示されたような化学構造の有機化合物Sは、両親媒性を示す。

【0090】

続いて、プローブ物質Pに対して、ラベル用物質Lをラベルする方法、即ち、キメラ物質Hの一実施例(有機化合物を介在させた例、図1等参照)の作製方法に係わる好適な実施例を三例、図6～8を参照して、順番に説明する。なお、以下の実施例では、プローブ物質Pが低分子化合物である場合を代表例として説明する。

【0091】

まず、図6に示す最初の例は、プローブ物質Pとして、制癌剤に応用されるレチノイドレセプターアゴニストを用いている。図6には、符号P₁で示されたレチノイドレセプターアゴニストが、ラベル用物質Lの末端アミノ基にアミド結合される際の反応が示されている。

【0092】

この化合物P₁のカルボキシル基と、ラベル用物質Lの末端アミノ基を、N, N-ジメチルホルムアミド(N, N-dimethyl formamide、DMF)、またはDMF-ジクロロメタン(dichloromethane) 9 : 1中、D I C及びH O B tで、室温、24～48時間反応させ、前記アミド結合を形成させる。

【0093】

次いで、固相担体X(トリチルリンカーを用いた場合)からの切断とF l a g ペプチド部分中のリジン残基の脱保護は、1% T F A / ジクロロメタン(dichloromethane)を用いて行う。F l a g ペプチド部分の全てのアミノ酸の脱保護には、T F A / H₂O = 9 : 1の条件で行う。

【0094】

次に、プローブ物質Pの他の例を2つ挙げる。一つ目の他の例は図7に示されている。この例では、スペーサである有機化合物Sの末端がカルボキシル基であるものを用い、ジヒドロキシサクシイミド(N-hydroxysuccinimide)を介して、図7に符号P₂で示されたような化学構造を有する低分子の医薬候補物質のアミノ基とのカップリングを行う。これは、DMF中、ジヒドロキシサクシイミドとD I Cで、室温処理することにより行う。

【0095】

図8に示す例は、アミノ基末端がブロモアセチル(bromoacetyl)化された低分子の医薬候補物質P₃と、スペーサである有機化合物Sの一末端がシステイン(Cystein)化された構成のラベル用物質(符号L_c)とを、トリエチルアミン(triethylamine、Et₃N) - DMF中室温で処理することによりカップリングする方法である。

【0096】

なお、前記ブロモアセチル化は、ジクロロメタン-ピリジン(dichloromethane-pyridine)中、塩化ブロモアセチル(bromoacetyl chloride)で処理することによって、容易に進行させることができる。

【0097】

なお、化合物の水酸基を用いる場合は、活性型アジピン酸(adipic acid, HO₂C(CH₂)₄CO₂H)やピメリン酸(pimelic acid, HO₂C(CH₂)₅CO₂H)などを水酸基に結合し、かつアミノ基

との反応性も持つような介在化合物を介して結合させるようにする。これらは全て、D I C等を用いた反応により、エステル結合、およびアミド結合の形成が可能である。

【0098】

以下、上記したような方法で、プローブ物質Pと、ラベル用物質Lと、から構成されたキメラ物質Hを用いて、細胞内外に存在する生体物質Bを捕捉し、回収し、構造解析し、さらには同定する方法について説明する。なお、図9、図10は、当該方法に係わる工程を簡略に示すフロー図である。

【0099】

＜生体物質の捕捉方法＞

【0100】

図9には、本発明に係る「生体物質の捕捉方法」の工程フロー図が簡潔に示されている。まず、所定の固相表面Fに対して、ラベル物質L（キメラ物質H）中のペプチドTを特異的に認識する抗体Aが予め固定化されている（図9の（I）参照）。

【0101】

次に、ラベル物質Lとプローブ物質Pとから構成された複合体（即ち、キメラ物質H）と、このキメラ物質H中のプローブ物質Pと相互作用した生体物質B（例えば、タンパク質）と、から構成される生体物質複合体Cを含む試料溶液Rを、前記固相表面F領域へ送液等して導く（図9の（II）参照）。

【0102】

そして、固相表面Fに固定化されている抗体Aと、前記生体物質複合体Cを構成するペプチドTと、の相互作用を進行させる（図9の（III）参照）。以上の手順を行うことによって、生体物質Bを、プローブ物質P及びラベル用物質Lを介して、固相表面Fに捕捉することができる。

【0103】

続いて、上記生体物質複合体C中のペプチドTと、固相表面Fに固定化された抗体Aと、を解離する（図10参照）。

【0104】

この解離方法は、固相表面F領域にペプチドTそれ自体を過剰量添加することにより、抗体Aに認識されてトラップされていたラベル用物質LのペプチドTと置換し、生体物質Bを伴った複合体Cとして液相中に溶出させることができる。

【0105】

なお、添付した図10には、過剰添加された遊離のペプチドTに置換されて、生体物質Bと、プローブ物質Pと、ラベル用物質Lと、から構成された前記複合体Cが、液相中に溶出し、遊離している様子が模式的に示されている。

【0106】

次に、解離させた生体物質複合体Cを固相表面Fから回収して、生体物質複合体C中の生体物質Bの構造解析を行う。さらには、プローブ物質Pと特異的な相互作用を示した生体物質Bを同定するに至る。

【0107】

＜細胞内に存在する生体物質（細胞内生体物質）の回収方法＞

【0108】

まず、有機化合物Sと、該有機化合物Sに結合され、かつ抗体Aを特異的に認識可能なペプチドTと、からなるラベル用物質Lを、前記有機化合物Sの一末端官能基を介して、選択されたプローブ物質Pにラベルすることにより（既述した「ラベル方法」を参照）、有機化合物Sを介在させたキメラ物質Hを作製する。

【0109】

次に、このラベルによって得られるキメラ物質Hを細胞内に導入する。具体的には、前記キメラ物質Hを適当な緩衝液（150mM NaCl Tris 50mM pH7.4等）に溶解する。

【0110】

図 1 1 は、符号 M で示す細胞内に、キメラ物質 H を導入する様子が模式的に示されている図であり、図 1 1 の (I) には、細胞 M 内に標的となる生体物質 B が存在している様子が示されている。

【 0 1 1 1 】

または、直接溶解し難い場合は、ジメチルスルホキド (dimethyl sulfoxide、DMSO) に一旦溶解した後、前記の緩衝液などで希釈し、HEK 2 9 3 細胞 (ヒト胚性腎由来培養細胞) などの培養細胞の培養液に添加する。

【 0 1 1 2 】

前記培養液に直接添加しても、キメラ物質 H が細胞 M 内に取り込まれない場合は、Polyfect Transfection Reagent (Qiagen 製) 等を用いて、キメラ物質 H を、細胞 M に導入し (トランスフェクション)、適切な時間 (2 4 - 4 8 時間後) 培養する。

【 0 1 1 3 】

これにより、キメラ物質 H 中のプローブ物質 P と細胞 M 内の生体物質 B との間の相互作用を細胞 M 内で進行させる。例えば、プローブ物質 P は細胞 M 内で、特定のタンパク質 (生体物質 B) と結合して、生体物質複合体 C を形成する (図 1 1 の (I I) 参照)。

【 0 1 1 4 】

次に、前記相互作用によって得られた生体物質複合体 C を細胞 M 外に取り出す作業を行う。

【 0 1 1 5 】

例えば、この生体物質複合体 C を、プローブ物質 P に結合されているラベル物質 L に含まれるペプチド T のアミノ酸配列を用いて、このアミノ酸配列に対する抗体 A を用いた公知の「免疫沈降法」によって、細胞 M 内から抽出することができる (図 1 1 の (I I I) 参照)。

【 0 1 1 6 】

抽出方法の一例は、次の通りである。まず、ラベル用物質 L がラベルされたプローブ物質 P、即ち、キメラ物質 H に該当する物質を導入した細胞 M を可溶化バッファー (例えば、2 0 m M HEPES, p H 7 . 5 , 1 5 0 m M NaCl, 5 0 m M NaF, 1 m M Na₃VO₄, 1 m M PMPSF, 1 % Triton X 1 0 0) を用いて可溶化する。この可溶化バッファーを加えたのち細胞 M を掻き取り、遠心管に回収し、超遠心 (5 5 , 0 0 0 回転, 4℃, 2 0 分) する。

【 0 1 1 7 】

続いて、固相表面 F に予め固定されている抗体 A と、前記生体物質複合体 C を構成する前記ラベル用物質 L 中のペプチド T と、の相互作用を進行させる (再び、図 2 参照)。

【 0 1 1 8 】

例えば、遠心後の細胞抽出液 (上清) に、例えば、特定のアミノ酸配列を特異的に認識する抗体 A を固定化したアガロースビーズ (Sigma 社) を加え、4℃で 3 時間攪拌することによって、前記相互作用を進行させることができる。

【 0 1 1 9 】

次に、前記生体物質複合体 C 中の細胞内生体物質 B を構造解析し、さらには、この細胞内生体物質 B を同定する。

【 0 1 2 0 】

例えば、前記攪拌後のビーズを遠心 (1 , 0 0 0 回転, 4℃, 1 分) して集め可溶化バッファーで洗浄後、FLAG ペプチド (符号 T) を含むバッファーを加えてビーズに結合したプローブ物質 P を溶出させることにより (図 9 参照)、このプローブ物質 P と相互作用した標的の細胞内生体物質 B 及びラベル用物質 L からなる複合体 C を回収し、このうちの生体物質 B の構造解析を行い、さらには、当該生体物質 B を同定する。

【 0 1 2 1 】

標的の細胞内生体物質 B がタンパク質である場合を例に説明すると、前記複合体 C の回収後は、相互作用の相手となった標的タンパク質を、公知のタンデム質量計 (MS/MS)

を用いる「質量タグ法」と称される公知の方法（羊土社「プロテオーム解析法」、磯辺俊明、高橋信弘編、P 1 2 9 ～ P 1 4 2）によって同定することができる。具体的な手順は以下の通りである。

【0122】

まず、回収したサンプルを、遠心濃縮後、酵素反应用バッファー（100mM Tris, pH 8.8）に溶解する。次に、特定のアミノ酸を認識し切断する酵素である「トリプシン」あるいは「リジルエンドペプチダーゼ」により消化分解する。

【0123】

これにより、酵素基質比（重量比）が1／100から1／50になるようにリジルエンドペプチダーゼを加え37℃で12時間程度反応させ、消化物を得ることができる。そして、その消化物をタンデム質量計で測定し、分解された各ペプチドの質量値と内部アミノ酸配列情報を得ることができる。

【0124】

酵素消化されたペプチド断片の質量値を用いて、データベース上から候補アミノ酸シーケンスを自動検索して選び出し、かつその配列が各アミノ酸でフラグメント化したときの質量値セットを計算する。

【0125】

なお、前記データベースは、既に公開されているタンパク質データベースである「SwissProt」（インターネットアドレス：[ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/sp-tr-nrdb/fasta/sprot.fas.Z](ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/sp-tr-nrdb/fasta/sprot.fas.Z)）と核酸データベースである「NCBI RefSeq」（インターネットアドレス：[ftp.ncbi.nih.gov/refseq/H-sapiens/mRNA-Prot/hs.faa.gz](ftp://ftp.ncbi.nih.gov/refseq/H-sapiens/mRNA-Prot/hs.faa.gz)）等を使用することができる。

【産業上の利用可能性】

【0126】

本発明は、プローブ物質と相互作用した物質を確実に捕捉、回収できるので、迅速かつ確かなターゲット生体物質を特定に利用できる。例えば、医薬候補化合物と相互作用する物質の同定を確実に行うことができ、毒性物質や内分泌攪乱物質を標的とする場合は、当該物質と相互作用する物質を同定できるので、毒性等の原因物質や機作を突き止めるができる。

【図面の簡単な説明】

【0127】

【図1】本発明に係るラベル用物質（L）及びキメラ物質（H）の一実施例の概念及び物質構成を示す模式図である。

【図2】固相表面（F）上に固定化された抗体（A）が、ラベル用物質（L）中のペプチド（T）を特異的に認識している状態を模式的に示す図である。

【図3】固相担体（X）にリンカー（Y）を介して結合したFlagペプチドの末端に、リジン残基（Lys）が一つ付加導入された構成を示す図である。

【図4】固相担体（X）に結合したFlagペプチド（T）に有機化合物（S）を導入する一実施例を示す図である。

【図5】両親媒性のラベル用物質（L）の化学構造の一例を示す図である。

【図6】プローブ物質（P）にラベル用物質（L）をラベルする方法（キメラ物質Hの作製方法）に関する好適な実施例を示す図である。

【図7】同方法の他の好適な実施例を示す図である。

【図8】同方法のさらに他の好適な実施例を示す図である。

【図9】本発明に係る「生体物質の捕捉方法」の工程フローを簡潔に示す図である。

【図10】過剰添加されたペプチド（T）に置換され、生体物質複合体（C）が液相中に溶出し、遊離している様子が模式的に示された図である。

【図11】細胞（M）内に、ラベル用物質（L）とプローブ物質（P）の複合体を導入したり、取り出したりする様子が模式的に示された図である。

【符号の説明】

【 0 1 2 8 】

A 抗体

B 生体物質／細胞内生体物質

F 固相表面

H キメラ物質（ペプチドとプローブ物質の異種物質複合体）

L, L c ラベル用物質

M 細胞

P (P ₁ , P ₂ , P ₃) プローブ物質

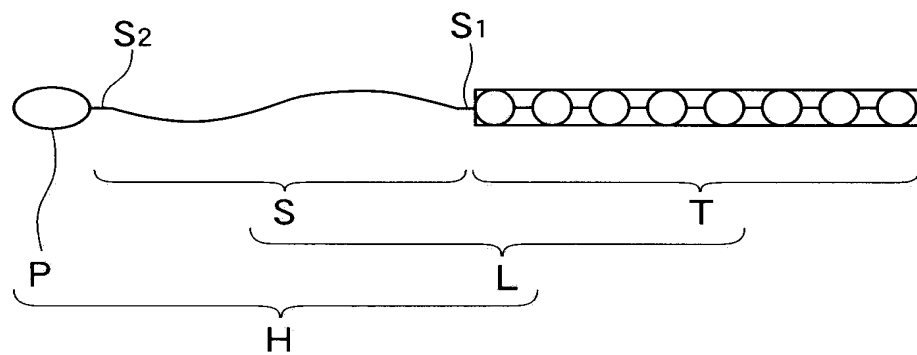
S 有機化合物

T ペプチド（例、エピトープ・タグペプチド）

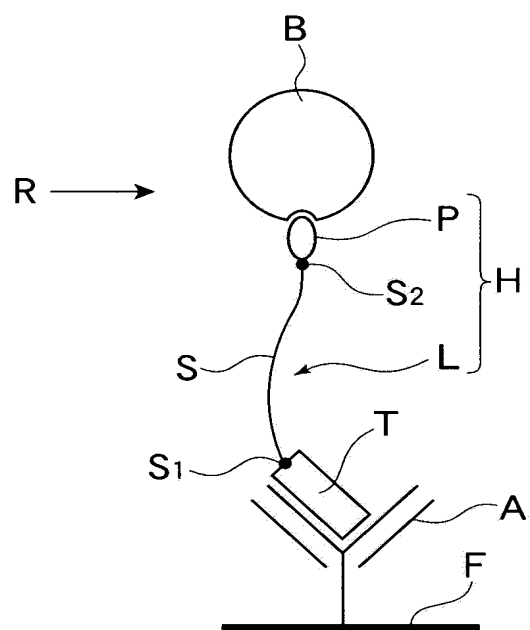
X 固相担体

【書類名】 図面

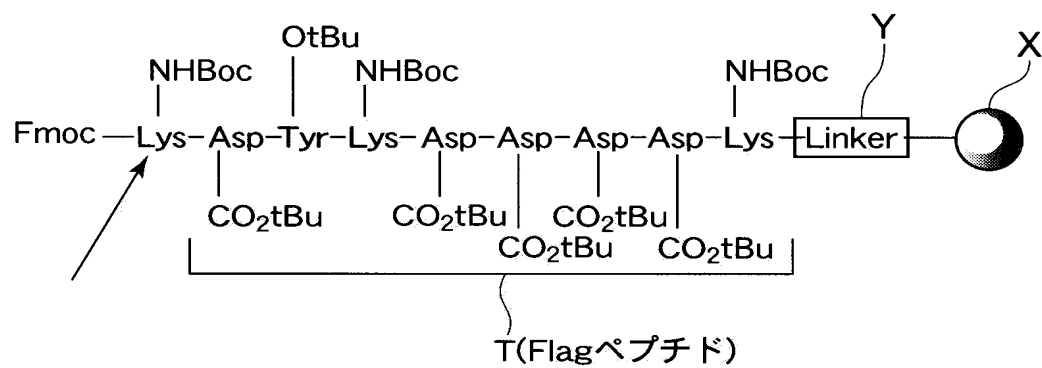
【図 1】



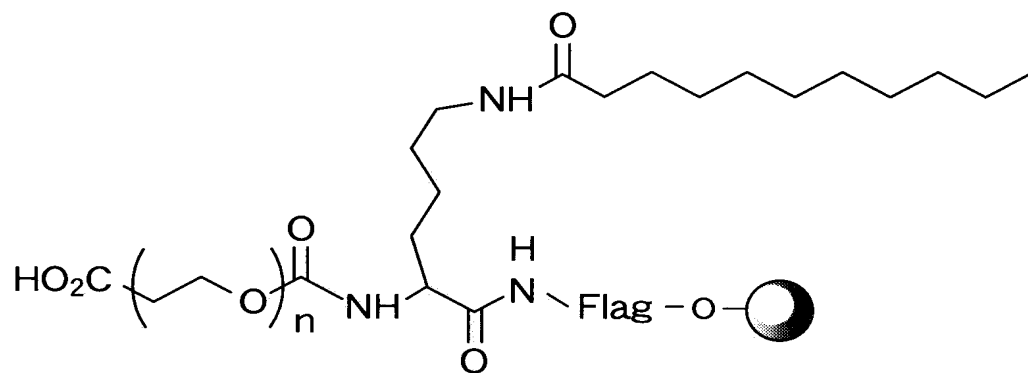
【図 2】



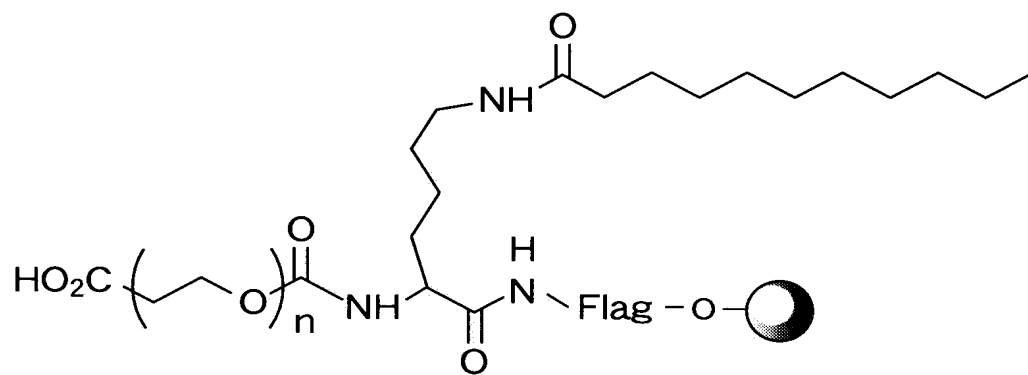
【図 3】

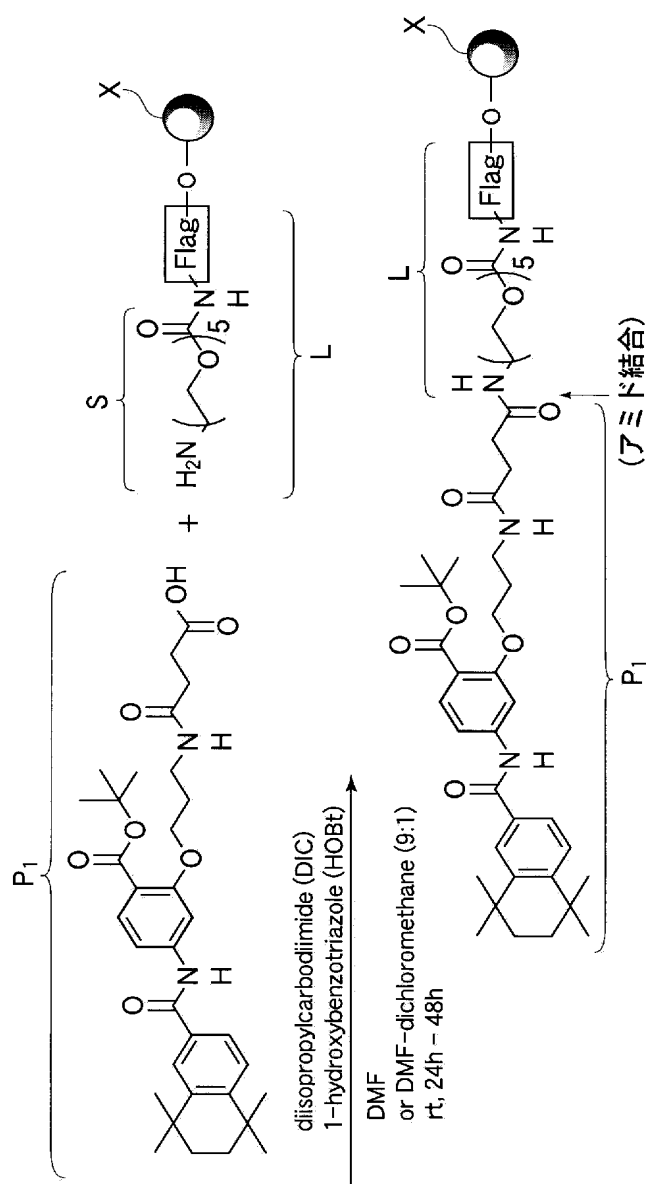


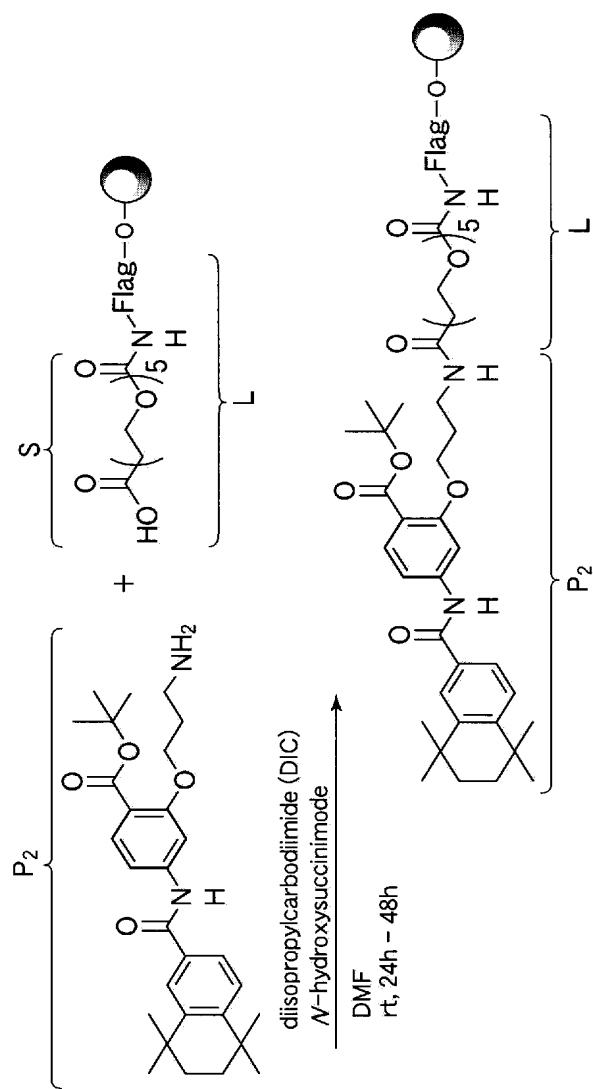
【 図 4 】

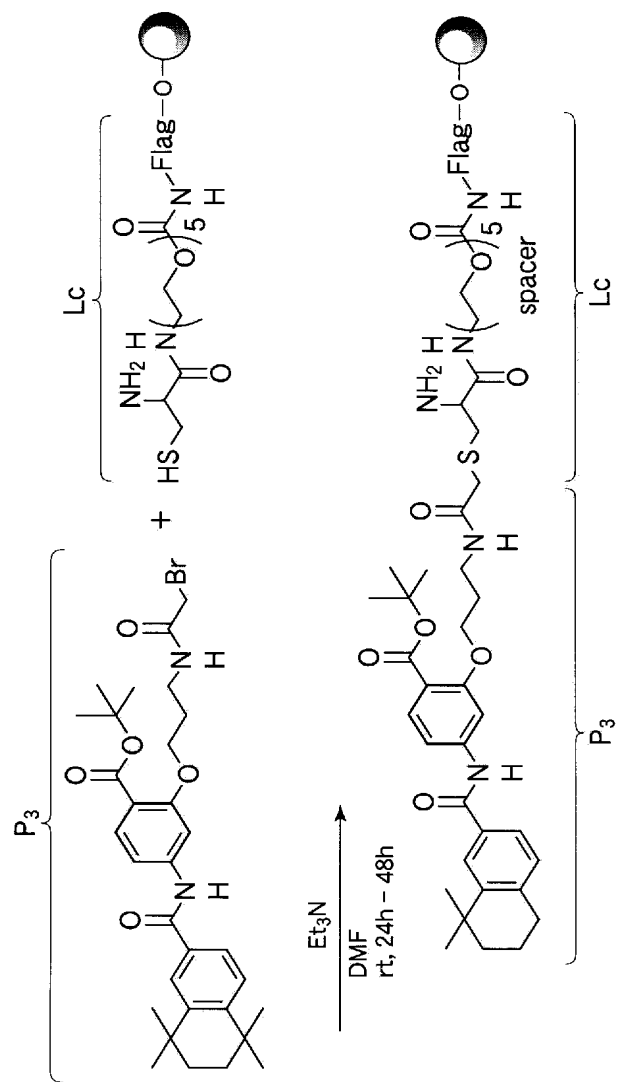


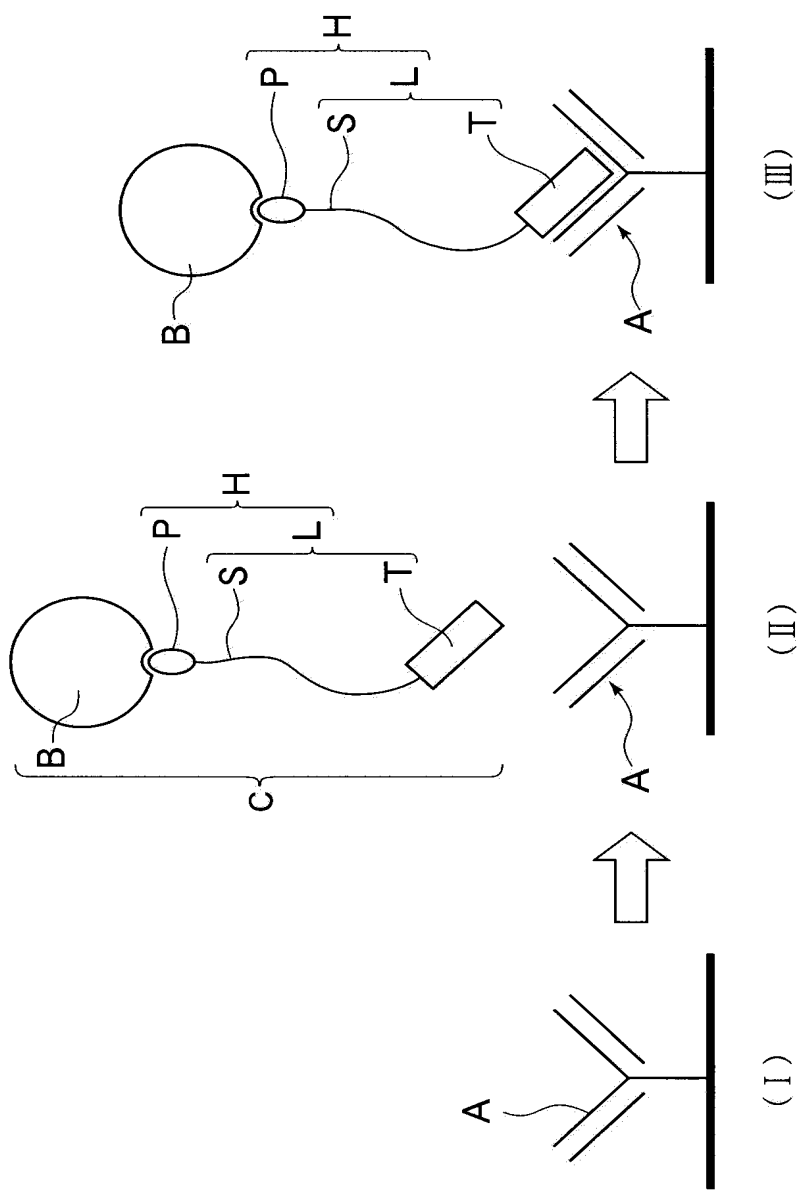
【 図 5 】

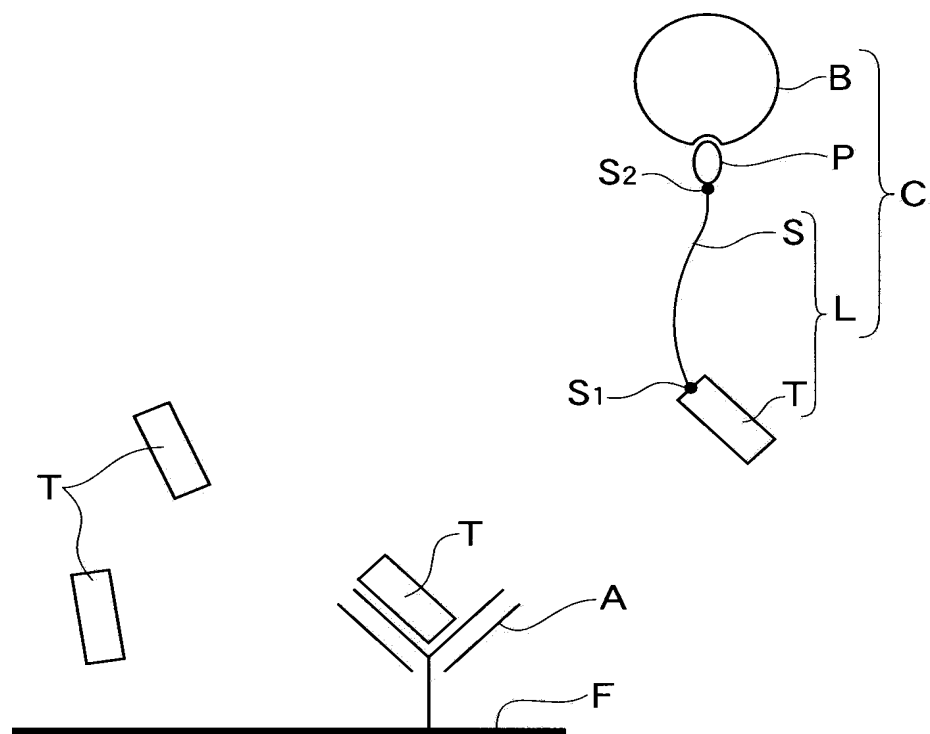




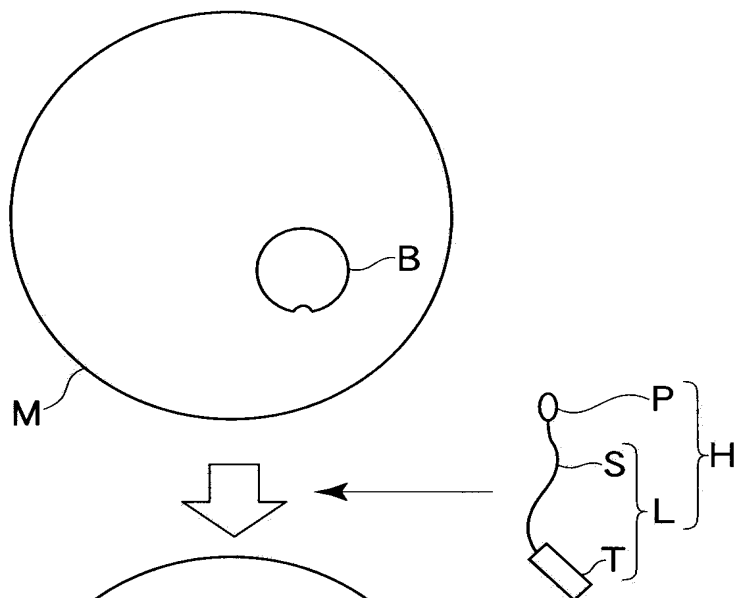




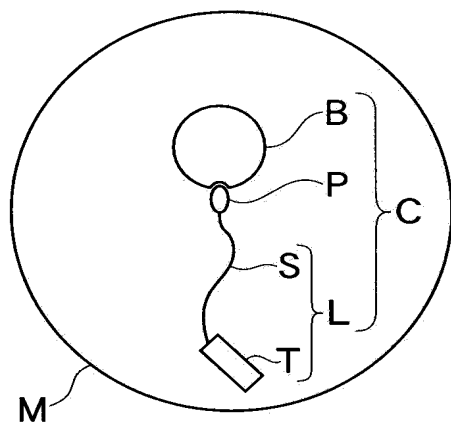




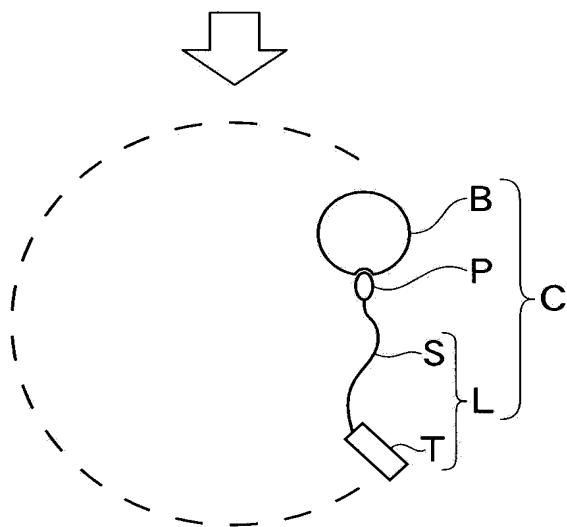
(I)



(II)



(III)



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 固相表面に対する可逆的固定（可逆的着脱）が可能なラベル用物質を提供し、このラベル用物質に結合させたプローブ物質と相互作用する標的生体物質を確実かつ高精度に同定する。

【解決手段】 （１）生体物質Ｂと相互作用可能なプローブ物質Ｐに結合可能な化学構造を有する有機化合物Ｓ、（２）該有機化合物Ｓに結合され、かつ抗体Ａが特異的に認識するペプチド、以上の（１）と（２）を構成物質とするラベル用物質Ｌ、並びに、少なくともペプチドと、ペプチド又はタンパク質以外のプローブ物質Ｐと、から構成されるキメラ物質を提供し、また、前記ラベル用物質Ｌの作製方法、並びに該ラベル用物質Ｌを用いて生体物質を捕捉、構造解析又は／及び同定する方法などを提供する。

【選択図】 図２

出願人履歴

5 0 0 3 5 2 8 4 5

20000728

新規登録

東京都目黒区目黒 1－1 7－2 1－1 0 3

夏目 徹

5 0 1 4 5 3 4 7 7

20011122

新規登録

東京都文京区千駄木 5－1 3－6

新家 一男

5 0 4 1 2 8 5 0 7

20040331

新規登録

神奈川県横浜市栄区本郷台 1－1 7－5

土井 隆行